

**ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG EINES
POLYVALENTEN PROTEASE-INHIBITORS
AUS LUMBRICUS TERRESTRIS**

Kurt Illchmann

1975

DISSERTATIONS- UND FOTODRUCK FRANK oHG
8 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2 8 0 9 0 9 0

Aus dem Institut für Klinische Chemie und Klinische
Biochemie der Universität München

Kommiss. Leiter: Professor Dr. rer. nat. H. Fritz

ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG EINES POLYVALENTEN
PROTEASE-INHIBITORS AUS LUMBRICUS TERRESTRIS

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung
der

Doktorwürde

in der gesamten Medizin

an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Kurt Illchmann
aus Regensburg

München 1975

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. H. Fritz

Dekan: Prof Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 16. 12. 1975



Meiner lieben Mutter



Digitized by the Internet Archive
in 2026

INHALTSÜBERSICHT

	Seite
A. Überblick der Proteinase-Inhibitor-Forschung	1
I. Inhibitoren menschlichen und tierischen Ursprungs	1
II. Inhibitoren pflanzlichen Ursprungs	4
III. Physiologische Funktion der Inhibitoren	5
B. Protease-Inhibitoren in der Therapie	8
C. Eigene Untersuchungen	14
I. Isolierung der Inhibitoren aus Regenwürmern	14
1. Vorversuche	14
2. Gewinnung des Rohextraktes und Eiweißfällung	15
3. Filtration an Sephadex G-25	16
4. Isolierung durch Affinitätschromatographie	16
5. Ionenaustauschchromatographie an SP-Sephadex C-25	17
6. Spezifische Aktivität	18
II. Charakterisierung	19
1. Hemmverhalten	19
a) Hemmspektrum	19
b) Hemmkurven	19
c) Temporäre Hemmung	22
2. Bestimmung der Endgruppen	22
3. Aminosäurezusammensetzung	23
III. Untersuchungen am reaktiven Zentrum	23
1. Definition des Hemmzentrums	23

2. Modifizierung von Inhibitoren	25
a) Allgemeines	26
b) Modifizierung des RWI	26
D. Material und Methoden	26
I. Material	26
1. Enzyme	26
2. Substrate	27
3. Weitere Reagentien	27
II. Methoden	27
1. Aktivitätsbestimmung der Proteasen	27
a) Trypsin	27
b) Chymotrypsin	28
c) Plasmin	28
d) Kallikrein	28
e) Leukozytenproteasen	28
2. Bestimmung der Inhibitoraktivität	29
3. Gewinnung der Extrakte	30
a) Herstellung des Homogenates	30
b) Enteiweißung mit Perchlorsäure	30
c) Einengung	30
d) Gelfiltration	30
4. Isolierung der Inhibitoren mittels Affinitäts- chromatographie	31
5. Ionenaustauschchromatographie an SP-Sephadex	31

6. Bestimmung der spezifischen Aktivität	32
7. Charakterisierung der Inhibitoren	32
a) Aminosäureanalysen	32
b) Molekulargewichtsbestimmung	32
c) Bestimmung der N-terminalen Gruppen	33
8. Untersuchungen am reaktiven Zentrum	33
a) Modifizierung von Lysylresten	33
b) Modifizierung von Arginylresten	34
c) Umsetzung mit Carboxypeptidase B	34
F. Zusammensetzung	34
F. Literatur	36

A. Überblick der Proteinasen-Inhibitorforschung

I. Inhibitoren menschlichen und tierischen Ursprungs.

Die Erforschung der Proteinasen-Inhibitoren begann vor etwas über 100 Jahren mit den Beobachtungen verschiedener Naturwissenschaftler, die Betrachtungen über die Widerstandsfähigkeit des menschlichen Verdauungstraktes gegenüber den in diesen sezernierten proteolytischen Fermenten anstellten (8, 68, 84).

1878 inkubierte LEON *Ascaris marginata* des Hundes in Pankreassekret und sah sie mehrere Tage lang nicht in Lösung gehen (60). 1903 griff der Münchner Physiologe WEINLAND diese Experimente auf und wiederholte sie mit Darmparasiten von Haustieren, die er mehrere Tage lang mit Trypsin- und Pepsinlösungen versetzte (88). Deren Widerstandsfähigkeit sowie die Unangreifbarkeit von Fibringerinseln, die mit Ascarisextrakt versetzt waren, gegenüber proteolytischen Enzymen führte WEINLAND auf die Wirkung von "Antifermenten" zurück, die sich durch Alkoholfällung aus Ascarisextrakten anreichern ließen. Den Begriff "Antiferment" hatte bereits FRFNZEL 1891 geprägt (26).

Etwa um die gleiche Zeit, 1894, wurden Beobachtungen über die antitryptische Aktivität des menschlichen Serums veröffentlicht (22), drei Jahre später bereits drei Arbeiten über die Proteinase-Inhibitoren des Serums (16, 39, 71).

LANDSTEINER lokalisierte 1900 die antitryptische Aktivität durch fraktionierte Fällung der Serumproteine in der Albuminfraktion (55). Anschließend bemühten sich mehrere Arbeitskreise um die Aufklärung der chemischen Natur dieser Proteinase-Inhibitoren (6, 46, 74). Diese wurden zunächst für Lipide gehalten, während andere Arbeitsgruppen die "Antifermente" als Antikörper des Immunsystems klassifizierten (20, 41, 65, 92).

Daneben wurde bereits die Höhe der antitryptischen Aktivität während des Verlaufes verschiedener Infektionskrankheiten, vor allem bei Pneumonie, untersucht. ASCOLI und BEZZOLA (2) fanden erhöhte Hemmkapazität während des Stadiums der Anschoppung und der roten Hepatisation und eine Abnahme während des Stadiums der grauen Hepatisation.

Abweichende Werte vom Normalgehalt des Serums ergeben sich auch bei anderen Infektionskrankheiten (10, 48, 93).

BRIEGER und TREFRING (13) entdeckten schließlich 1908 einen erhöhten Gehalt an Seruminhibitoren bei Carcinom-erkrankungen.

Etwa von dieser Zeit an stagnierten die Forschungen auf diesem Gebiet, bedingt durch die unzureichenden biochemischen Arbeitsmethoden, und erfuhren erst wieder 1929 eine Belebung durch die Entdeckung eines Hemmkörpers für Kallikrein und Trypsin durch KRAUT, FREY und WERLE (5, 49, 50) in verschiedenen Organen des Rindes (Lymphknoten, Parotis, Milz, Leber, Pankreas und Lunge). 1936 gelang KUNITZ (53) die Isolierung des kristallinen Kallikrein-Trypsin-Inhibitors aus Rinderpankreas. Von da an nahm die biochemische Erforschung dieses Gebietes einen steilen Aufschwung.

Eine stetig zunehmende Zahl von Arbeitskreisen bediente sich der verbesserten Methoden der Biochemie und vervollständigte die Verfahren zur Isolierung, Bestimmung der Eigenschaften, Hemmspektren sowie der Aminosäurezusammensetzung und Struktur einer rasch wachsenden Zahl von Proteaseninhibitoren aus menschlichen und tierischen Organen bzw. Sekreten (85). Aus der Vielzahl der Arbeiten seien kurz die Meilensteine erwähnt.

1941 nahm sich COLLIER (18) wieder des Hemmstoffes aus *Ascaris lumbricoides* an und isolierte mit dem von KUNITZ und NORTHROP (53) angegebenen Verfahren ein amorphes Präparat. PEANASKY (69) gelang der Nachweis eines Chymotrypsin-Hemmkörpers und WFPLE (90) fand auch eine Hemmung von Kallikrein durch *Ascaris*-Extrakte.

Auch den Proteasen-Inhibitoren des Serums wurde seit 1950 verstärktes Interesse entgegengebracht und eine größere Zahl von Arbeitskreisen beschäftigte sich mit der Isolierung der einzelnen Komponenten (61), die schließlich als 6 Glykoproteide definiert werden konnten (42).

1948 entdeckte KAZAL (47) in Rinderpankreas einen selektiven Trypsin-Thrombin-Inhibitor, der nicht mit dem von WFPLE und von KUNITZ beschriebenen identisch ist.

Von großem Interesse ist das Auftreten polyvalenter Proteasen-Inhibitoren in Flüssigkeiten und Drüsen-sekreten des menschlichen Körpers.

ASTRUP fand in Harn eine trypsinhemmende Komponente, die er Mingin nannte (3).

HAFNDLF entdeckte in Sperma und in Vesiculardrüsen des Mannes und aller untersuchten Säugetiere (38) einen Proteasen-Inhibitor, etwas später auch in Nasen- und Bronchialschleimhaut sowie deren Absonderungen (37).

MARTIN und AXELROD (62) konnten in Haut das Vorkommen eines Inhibitors von Dermoproteinasen nachweisen.

II. Inhibitoren pflanzlichen Ursprungs.

Relativ spät erst wurde man auf die in Pflanzen enthaltenen Proteasen-Inhibitoren aufmerksam. Aufgrund von Überlegungen über die bei Tieren durch Fütterung mit Sojabohnenmehl beobachtete Wachstumshemmung entdeckten HAM und SANDSTEDT sowie BOWMAN 1944 den ersten Vertreter dieser Substanzgruppe (12, 40). Grundlegende Arbeiten über Isolierung und Eigenschaften des Inhibitors aus Sojabohnen wurden von KUNITZ durchgeführt, der diesen selbst und den Trypsin-Inhibitor-Komplex kristallisierte (54).

Der Sojabohnen-Inhibitor wurde von allen natürlich vorkommenden Proteinasen-Inhibitoren am eingehendsten untersucht und von vielen Arbeitskreisen als Modellsubstanz für Untersuchungen über Kinetik und Thermodynamik der Trypsin-Hemmung sowie der Polypeptideigenschaften allgemein verwendet, da er als leicht darstellbares, salzfreies und kristallines Produkt im Handel ist.

Als nächster wurde ein Inhibitor in Limabohnen entdeckt (25, 79), schließlich in Gartenbohnen, Feldbohnen, Pferdebohnen, Mungbohnen, Erbsen, Linsen, Luzernen und Erdnüssen (85). Aber nicht nur Leguminosen enthalten Proteasen-Inhibitoren. 1951 konnte WERLE nachweisen, daß Rohextrakte aus Kartoffelknollen die blutdrucksenkende Wirkung von Kallikrein verhindern konnten (89). Daneben findet sich auch ein Trypsin-(76) und ein Chymotrypsin-Inhibitor (72) in der ganzen Kartoffelpflanze.

Keimende Gerste (7) vermag Trypsin und pflanzen-spezifische Proteasen zu hemmen, ebenfalls Weizenkeimlinge (59). Auch in Runkelrüben und Zuckerrüben findet

sich, vor allem im Wurzelgewebe, proteolysehemmende Aktivität (86).

III. Physiologische Funktion der Inhibitoren.

Nach dieser kurzen Übersicht erhebt sich zwangsläufig die Frage nach der physiologischen Funktion dieser Substanzen. Sie ist, trotz aller Fortschritte der letzten 40 Jahre in der Biochemie dieses Spezialgebietes, noch völlig ungeklärt. Das gilt besonders für die Inhibitoren pflanzlichen Ursprungs, deren Aufgabe in der Verhinderung proteolytischer Vorgänge im Ruhestadium der Samen vermutet wird (75). Bei den Leguminosen und anderen, symbiotisch mit Bakterien lebenden Pflanzen wird die Funktion im Schutz pflanzlichen Gewebes vor bakterieller Überwucherung diskutiert (57). Bei Verletzungen mechanischer Art oder durch Insekten an Blättern von Kartoffel- und Tomatenpflanzen steigt die Konzentration der Proteasen-Inhibitoren in dem betroffenen Gewebe deutlich an (33).

Etwas konkretere Vorstellungen herrschen auf dem Gebiet der menschlichen und tierischen Proteasen-Hemmkörper, da mit den Beobachtungen über die Widerstandsfähigkeit der Darmparasiten gegenüber den proteolytischen Pankreasenzymen die Forschung auf diesem Spezialgebiet ihren Anfang nahm.

Weitgehend unklar ist jedoch die physiologische Funktion der Trypsin- und Chymotrypsin-Inhibitoren des Serums. Man weiß lediglich, daß ihre Konzentration hormoneller Kontrolle unterliegt (11). TSCHESCHE (30) vermutet, daß die Inhibitoren bei der Steuerung des Hormonspiegels gewisser Polypeptidhormone im Blutkreislauf beteiligt sind und konnte ein insulinabbauendes Sulfhydrylenzym in menschlichem und Rattenserum, dessen

Nachweis BRUSH (14) gelang, durch Proteasen-Inhibitoren in vitro hemmen. Daraus ergeben sich interessante Aspekte bezüglich Entstehung und neuen Therapiemöglichkeiten des Diabetes mellitus.

Überdies dürften die Plasma-Inhibitoren vielfältige Regel- und Kontrollfunktionen ausüben. Besonders bedeutungsvoll ist das α_1 -Antitrypsin in der α_1 -Globulinfraktion, dessen Anteil über 90 % der trypsin-hemmenden Kapazität des Serums beträgt (42). So wird bei Homozygoten mit genetisch bedingtem α_1 -Antitrypsinmangel wesentlich erhöhte Anfälligkeit für Lungenemphysem beobachtet (58).

Sinnvoll scheint die Deutung der Funktion der sekretorischen Pankreasinhibitoren bei allen Säugetieren zur Verhinderung der vorzeitigen Aktivierung der Verdauungsenzyme durch Hemmung des aktivierenden Trypsins in den Acinuszellen der Drüse und im Gangsystem zu sein. Als Beweis ist die gleichzeitige Sekretion der Pankreas-Inhibitoren mit den Zymogenen anzusehen (29), ferner ihre begrenzte Spezifität und die temporäre Wirksamkeit, welche nach gewisser Zeit dem gehemmten Trypsin im Darmtrakt wieder seine proteolytische Wirksamkeit verleiht.

Nicht klar erkennbar dagegen ist die Aufgabe des gewebsständigen Trypsin-Kallikrein-Inhibitors nach KUNITZ, da er nur bei Wiederkäuern auftritt und eher im Zusammenhang mit deren Stoffwechsel zu sehen ist (85).

Die Inhibitoren im Sperma des Mannes und der Säugetiere hemmen Akrosin, das trypsinähnliche Enzym in der Akrosomenkappe des Spermium, das für die Durchdringung der Zona pellucida der Eizelle während des Befruchtungsvorganges verantwortlich ist (95). Die

Akrosin-Aktivität ist in den in der Epidydimis gespeicherten Spermien hoch, fehlt aber in ejakulierten Spermien, die mit Vesiculardrüsensekret in Berührung kamen. In "kapazitierten" Spermien, die längere Zeit im sauren Milieu des weiblichen Genitaltraktes verweilten, tritt die Aktivität durch Dissoziation des Akrosin-Inhibitor-Komplexes wieder auf. ZANEVELD, POLAKOSKI, ROBERTSON und BUCKLEY (95) sowie STAMPAUGH und BUCKLEY (78) konnten in vitro demonstrieren, daß kapazitierte Spermien durch Inkubation mit den Inhibitoren der Vesiculardrüsen wieder dekapazitiert werden. Diese Befunde eröffnen neue Möglichkeiten für eine Kontrazeption mittels Proteasen-Inhibitoren und werden in den genannten amerikanischen Arbeitskreisen und von FRITZ (30, 42) weiter verfolgt. Die hormonelle Steuerung der Synthese der Spermaplasma-Inhibitoren in den Vesiculardrüsen ist bekannt (35). Ob dadurch ein Schutz der weiblichen Schleimhäute gegenüber der beträchtlichen Menge lysosomaler, proteolytischer Enzyme der Spermien bewirkt werden soll oder ob eine andere physiologische Funktion bezüglich der Kapazitierung vorliegt, ist noch ungeklärt.

Auch im Cervixsekret der Frau findet sich ein niedermolekularer Trypsin-Chymotrypsin-Inhibitor (36). Interessant ist in diesem Zusammenhang die Hemmung von Trypsin und Akrosin durch Ovoinhibitoren und Ovomucoide aus Geflügeleiern (21).

Trotz all dieser Erkenntnisse steht die Erforschung der spezifischen Enzym-Inhibitor-Wechselwirkung sowie ihrer physiologischen und pathophysiologischen Bedeutung erst am Anfang und dürfte noch bedeutsame Ergebnisse bringen.

B. Proteasen-Inhibitoren in der Therapie

Der einzige Proteasen-Inhibitor, der heute in großem Umfang mit einem relativ weiten Indikationsgebiet klinisch angewandt wird, ist der von WERLE (49) entdeckte und von KUNITZ (53) isolierte polyvalente Trypsin-Kallikrein-Inhibitor aus Rinderorganen, der unter dem Namen Trasylol^R von der Bayer AG in Wuppertal-Elberfeld hergestellt und vertrieben wird. Alle anderen Inhibitoren tierischen oder pflanzlichen Ursprungs konnten sich bisher trotz ähnlicher Eigenschaften für den klinischen Gebrauch nicht durchsetzen, was vor allem auf das Auftreten allergischer oder entzündlicher Reaktionen infolge ihres höheren Molekulargewichtes zurückzuführen ist.

Einige Zeit nach der Reindarstellung des Hemmkörpers begannen klinische Versuche zur Therapie der Pankreatitis (91) aufgrund folgerichtiger Überlegungen zur Pathophysiologie dieser Erkrankung, deren Ursache man damals in einem übermäßigen Anstieg der Trypsinkonzentration und damit verbundener Selbstverdauung des Pankreas sah. Mit der Entwicklung exakter Methoden zur Bestimmung von Enzymaktivitäten erkannte man jedoch, daß größere Mengen aktivierten Trypsins in Pankreas oder Blut nicht nachweisbar waren. Heute nimmt man an, daß kleine Mengen Trypsin, durch initiale Noxen freigesetzt, Phospholipase A und Elastase aktivieren, die letztlich die Autolyse bewirken. Während die Elastase vorwiegend die Gefäße angreift und zu Hämorrhagien führt, bewirkt Phospholipase A über die Bildung der toxischen Produkte Lysolecithin und Lysokephalin aus Lecithin und Kephalin direkt eine Zellnekrose (19). Auf dem gleichen Weg wird Kallikreinogen zu Kallikrein aktiviert, was zur Bildung von Bradykinin und Kallidin führt, die beide erhöhte Gefäßdurchlässigkeit und Gefäßdilatation bewirken, worauf das Pankreasödem und der allgemeine Schock bei der

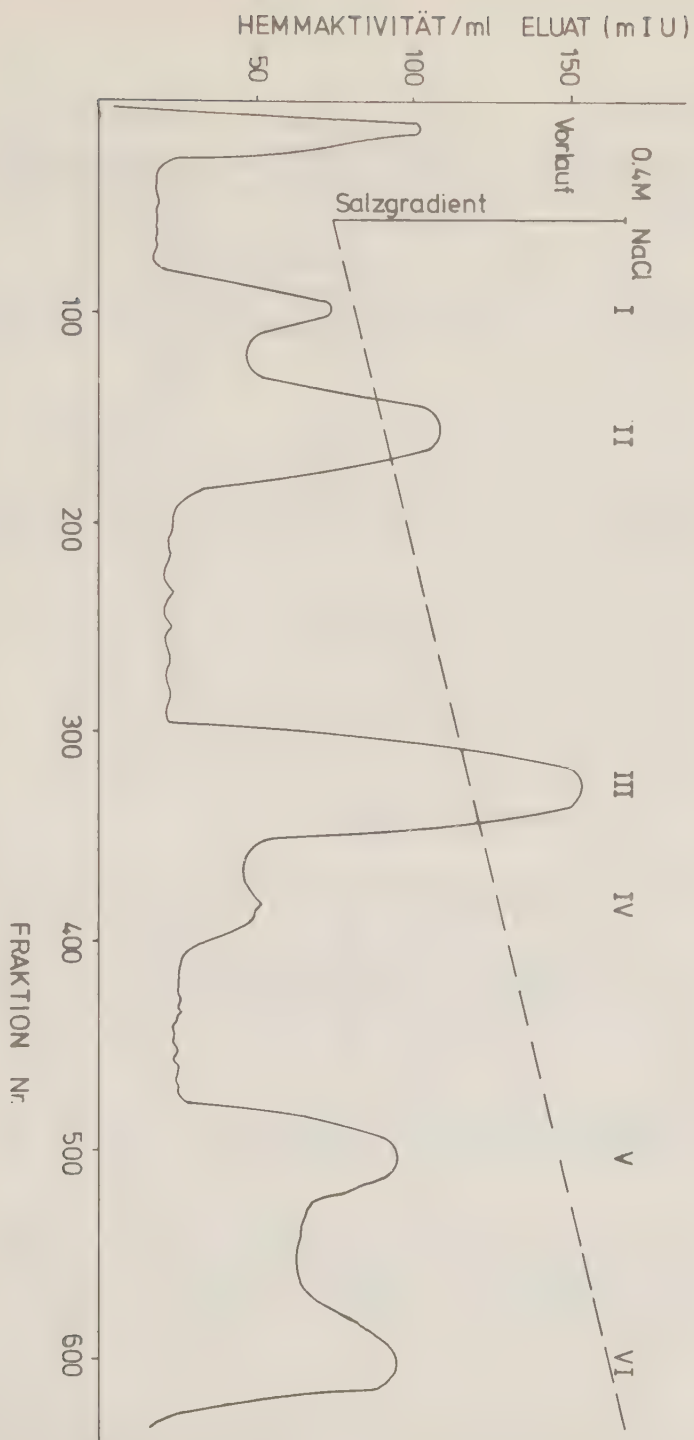


Abb. 1 Ionenaustauscherchromatographie an SP-Sephadex C-25

akuten Pankreatitis zurückzuführen sind. Die Parenchymnekrosen führen zum weiteren Austritt von bereits teilweise aktivierten Enzymen. Lipase verursacht gemeinsam mit Phospholipase A die Fettgewebnekrosen in der Umgebung des Pankreas, wobei aufgestaute Gallensäuren bei Verschuß der ableitenden Gallenwege diesen Prozeß noch aktivieren (Abb. 1).

Es ist nun nicht eindeutig geklärt, ob der Trypsin-Kallikrein-Inhibitor den pathophysiologischen Ablauf der Pankreatitis durch Trypsinhemmung allein blockiert, andererseits kann die aktivierende Wirkung des Trypsins auf die inaktiven Vorstufen der Pankreasenzyme nicht ausgeschlossen werden. CREUZFELDT (19) und WANKE (87) betrachten das durch Phospholipase A aus Lecithin abgespaltene Lysolecithin als Hauptverantwortlichen der Zellnekrose. Phospholipase A wiederum kommt in hohen Konzentrationen in menschlichem Pankreasgewebe vor und wird schon von geringsten Mengen freien Trypsins aktiviert. Aus diesem Blickwinkel wird die Bedeutung der Trypsinhemmung verständlich.

Der wichtigste therapeutische Effekt des Trypsin-Kallikrein-Inhibitors aber liegt in seiner Fähigkeit, Kininogenasen zu hemmen. Diese treten bei allen Schockformen auf, gleichgültig ob der Schock aus einer Traumatisierung, bakteriellen Infektion, Pankreatitis, aus einem Blutverlust oder anderen akuten Ereignissen resultiert, und spalten Kininogen zu Bradykinin bzw. Kallidin, kurz Kinine genannt, die ein am Schockgeschehen beteiligtes wichtiges Prinzip darstellen (82).

Auch in der Pathologie der Entzündung spielen Kinine eine entscheidende Rolle (81). Ein Überblick der pathophysiologischen Reaktionen bei akuter Pankreatitis unter Beteiligung der Kinine ist in Abb. 2 gegeben.

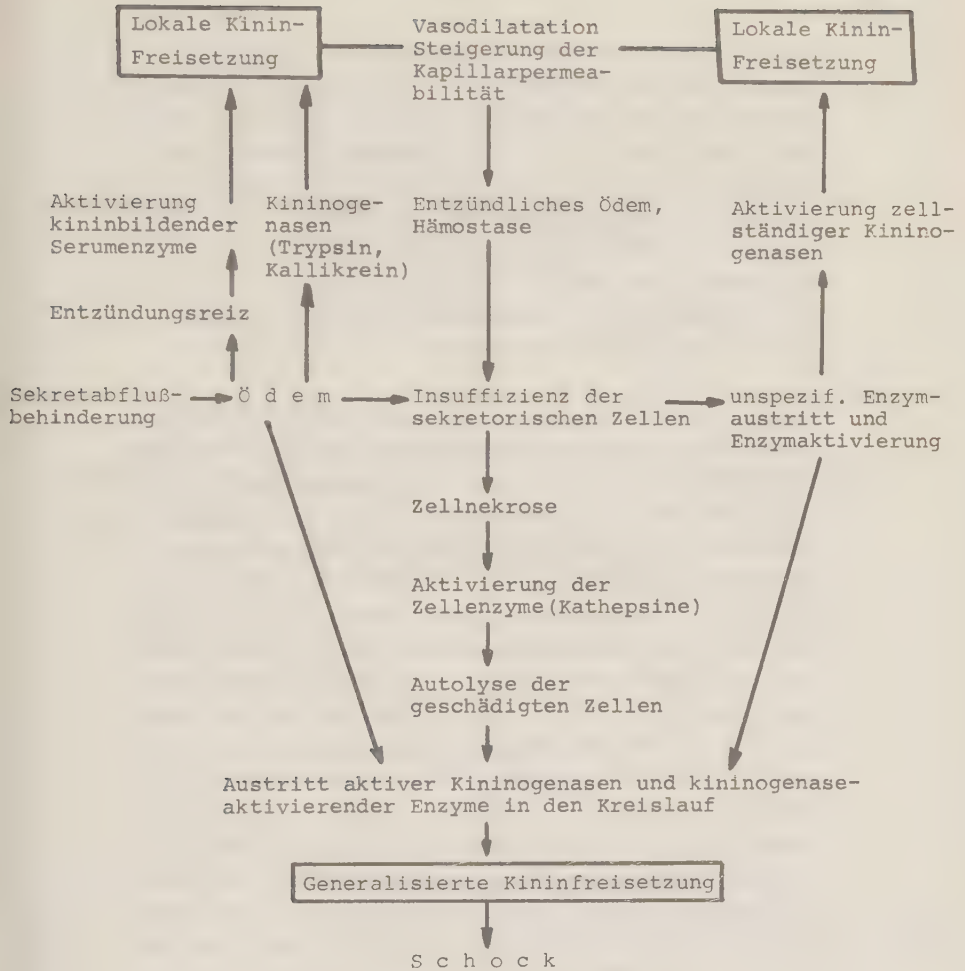


Abb. 2 Freisetzung von Kininen im pathophysiologischen Ablauf der akuten Pankreatitis (83)

Abb. 3 zeigt die Stellen, an denen der polyvalente Trypsin-Kallikrein-Inhibitor in den Ablauf des pathophysiologischen Geschehens durch Hemmung von Trypsin, Kallikrein und der als Kininigenasen bezeichneten Proteasen eingreift. Von besonderer Bedeutung ist dabei das breite, unspezifische Wirkungsspektrum des Trasylol^R, da die an diesem Prozeß teilnehmenden Enzyme nicht charakterisiert sind. Versuche mit anderen Inhibitoren tierischer und pflanzlicher Herkunft zeigten keinen therapeutischen Erfolg.

Ein weiteres wichtiges Anwendungsgebiet des Trypsin-Kallikrein-Inhibitors betrifft die Beeinflussung der Blutgerinnung. Die starke Plasminhemmung des Trasylol^R veranlaßte MARX und WERLE (63), diese als Therapeutikum bei Hyperfibrinolyse vorzuschlagen. Nach chirurgischen Eingriffen, gynäkologischen Operationen, in der Geburtshilfe, nach ausgedehnten Traumen, Stresszuständen und bei entzündlichen Reaktionen kann es zu Störungen des Gleichgewichts zwischen Plasmin und seinem Serum-inhibitor und damit zu einer Hyperfibrinolyse kommen. Die Hemmung der Fibrinolyse durch Trasylol^R läßt sich sowohl in vitro als auch in vivo nachweisen und wird anhand des Thrombelastogrammes verfolgt (64). Das Hemmvermögen des polyvalenten Trypsin-Kallikrein-Inhibitors beträgt ein Vielfaches der bisher verwendeten ϵ -Aminocaprönsäure, eine Kombination der beiden Substanzen dagegen wirkt stärker antifibrinolytisch als die Einzelkomponenten.

Ein weiteres, äußerst wichtiges Anwendungsgebiet der Proteasen-Inhibitoren scheint sich in der Therapie der Neoplasmen anzubahnen (73). Seit längerem ist bekannt, daß in Tumorgewebe und dessen Interstitialflüssigkeit höhere Proteasenaktivität als in Serum oder anderen Körperflüssigkeiten nachweisbar ist.

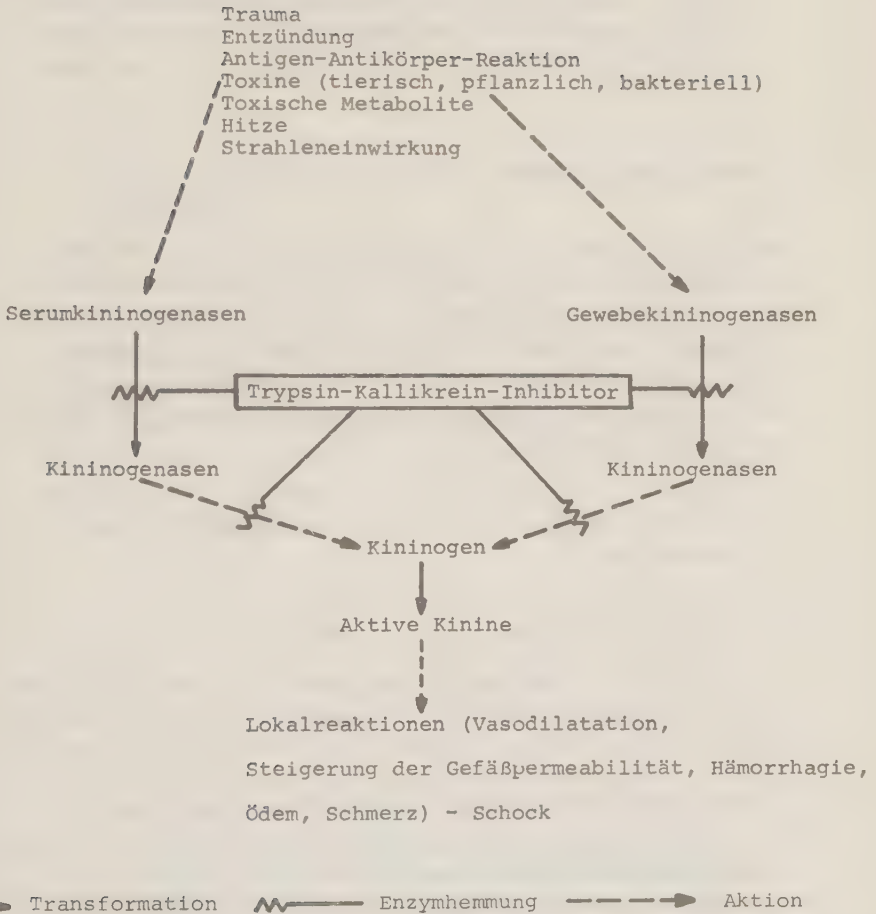


Abb. 3 Hemmung der Kininbildung durch den polyvalenten Trypsin-Kallikrein-Inhibitor (Trasylol) unter verschiedenen pathologischen Einflüssen (83)

Möglicherweise ist darin die Ursache des destruktiven Wachstums maligner Tumore zu sehen. Folgerichtig hemmt auch eine Anzahl synthetischer und natürlicher Proteasen-Inhibitoren selektiv das Wachstum transformierter Zellen, während normale Zellen nicht oder in geringerem Maße beeinflusst werden.

C. Eigene Untersuchungen

Nach der Isolierung von Trypsin-Plasmin-Inhibitoren aus Blutegeln durch FRITZ (42) und von Trypsin-Chymotrypsin-Pepsin-Inhibitoren aus *Ascaris lumbricoides* durch PEANASKY (70) schien es interessant, das Vorkommen von Proteasen-Inhibitoren im Regenwurm (*Lumbricus terrestris*) zu untersuchen, einem zahlreich auftretenden Verwandten der beiden vorgenannten Metazoa.

I. Isolierung der niedermolekularen Inhibitoren aus Regenwürmern.

1. Vorversuche

Aus einem in Wasser homogenisierten und zentrifugierten Auszug von Regenwürmern ließ sich keine antitryptische Aktivität, sondern im Gegenteil verstärkte Spaltung des bei dem Hemmtest verwandten Substrates BAPA beobachten. Dies ist auf das Auftreten proteolytischer Enzyme im Verdauungstrakt des Regenwurmes zurückzuführen. BEWLEY und De VILLEZ (9) konnten darin fünf Proteasen nachweisen, darunter je eine trypsin- und eine carboxypeptidaseähnliche. Erst nach Ausfällung der höhermolekularen Enzyme fand sich im wässrigen Extrakt inhibitorische Aktivität gegen Trypsin, die offensichtlich in vivo

an Proteasen gebunden und damit maskiert ist. Untersuchungen zur Lokalisation der Inhibitoren durch vorsichtige Präparation eines großen Regenwurmes zeigten, daß die niedermolekularen Hemmstoffe im Magendarmtrakt enthalten sind, während der Haut-Muskel-Schlauch ebenfalls anti-tryptische Aktivität, jedoch höhermolekularer Natur, aufweist.

2. Gewinnung des Rohextraktes und Eiweißfällung mit Perchlorsäure

In fünf Arbeitsgängen wurden je 400 - 600 Gramm Regenwürmer mit entsalztem Wasser homogenisiert und anschließend zentrifugiert, der Rückstand noch zweimal aufgeschwemmt und zentrifugiert. Die Überstände wurden mit dem gleichen Volumen 6 proz. Perchlorsäure versetzt, nach gutem Rühren und einstündigem Stehen im Kühlschrank durch Faltenfilter filtriert und nach vorsichtigem Neutralisieren mit KOH-Lösung am Rotationsverdampfer eingengt.

		Eingesetzte Menge Regenwürmer in Gramm				
		430	410	649	418	566
1.	Überstand, mIU	72.000	71.000	67.500	69.500	108.000
2.	" "	2.300	2.200	3.000	2.700	4.200
3.	" "	800	1.000	1.800	900	1.800
Summe, mIU:		75.100	74.200	72.300	73.100	114.000

Tab. 1 Inhibitorausbeuten in den Überständen nach Homogenisieren, Eiweißfällung mit Perchlorsäure und Neutralisation.

Die Ausbeuten an Inhibitor pro Gramm Regenwurm sind um so größer, je verdünnter gearbeitet wird. Wenn Regenwürmer in Perchlorsäure direkt homogenisiert werden, sinkt die

Ausbeute um etwa 50 %. Der Inhibitorgehalt schwankt zwischen 100 - 200 mIU/Gramm Regenwurm.

	Eingesetzte Menge Regenwurm im Gramm				
	430	410	649	418	566
Inhibitorgehalt in mIU/Gramm RW	174	180	110	174	200

Tab. 2: Inhibitorkonzentration pro Gramm Regenwurm

3. Filtration an Sephadex G-25

Vor der präparativen Auftrennung der Inhibitoren an Sulfopropyl-Sephadex wurden die enteweißten und eingengten Extrakte an Sephadex G-25 entsalzt. Die Verluste betrugen rund 5 Prozent.

Aufgetragene Inhibitor- menge in mIU	Verluste	
	in mIU	in %
106.000	6.000	6.0
98.000	5.400	5.5

Tab. 3: Verluste bei Entsalzung über Sephadex G-25

4. Isolierung der Regenwurm-Inhibitoren durch Affinitätschromatographie

Die von FRITZ (30) eingeführten Methoden der Reindarstellung von Trypsin-Inhibitoren durch Bindung an wasserunlösliches Trypsinharz und anschließende Desorption stellten eine wesentliche Bereicherung und Vereinfachung auf diesem Gebiet dar. In diesem Fall wurde

käufliches Trypsin-Celluloseharz verwendet (Merck AG, Darmstadt). Der entsalzte und lyophilisierte Inhibitor wurde bei Eiskühlung in eine Suspension des Harzes in TRA-Puffer eingerührt, und nach wiederholter Kontrolle der Aktivitätsabnahme bei Stillstand derselben das Harz abzentrifugiert. Vom mehrfach in eiskaltem Puffer aufgeschwemmten und abzentrifugierten Harz wurde der Inhibitor in stark saurem KC1/HCl-Puffer abgelöst und nach Entsalzung und Lyophilisation der Ionenaustauscherchromatographie unterworfen.

5. Ionenaustauscherchromatographie an SP-Sephadex C-25

Der Inhibitor wurde in einer geringen Menge Äquilibriumspuffer gelöst, dessen pH-Wert etwas unter dem AusgangspH-Wert liegt und zur präparativen Auftrennung auf eine mit SP-Sephadex C-25 gefüllte Säule aufgetragen. Zur Elution erwies sich ein linearer Kochsalzgradient bei gleichem pH-Wert als geeignet. Mit dem Äquilibriumspuffer wurde Begleitprotein und eine Inhibitormenge ausgewaschen, die etwa 10 % der aufgetragenen Gesamtmenge entspricht. Zwischen den Inhibitorbestandteilen traten inhibitorisch aktive Bereiche auf, die insgesamt rund 50 % der aufgetragenen Gesamtmenge entsprechen (Abb. 1).

Aufgetragene Inhibitormenge in mIU	Vorlauf a) mIU b) %	F r a k t i o n e n					
		I	II	III	IV	V	VI
a) 102.000	9.600	6.200	8.000	15.200	3.900	9.400	8.400
b)	9.4	6.0	7.8	14.9	3.8	9.2	8.2

Tab. 4: Verteilung der Inhibitorfraktionen nach Ionenaustauscherchromatographie an SP-Sephadex C-25

Die Rechromatographie wurde lediglich mit Fraktion III durchgeführt, da die restlichen Fraktionen in zu geringer Menge anfielen. Die Bedingungen waren dieselben wie beim Hauptlauf.

6. Spezifische Aktivität

Tabelle 5 zeigt einen Überblick der spezifischen Aktivitäten des Inhibitors nach den einzelnen Reinigungsschritten. Beim Rohextrakt wurde diese nach Perchlorsäurefällung ermittelt, nach den verschiedenen Chromatographieverfahren durch genaue Einwaage des lyophilisierten Inhibitors und Austesten verschiedener Mengen der verdünnten Lösung.

Reinigungsschritt	spezif. Aktivität µg Protein/mIU	Ausbeute %	Anreicherung
Enteiweißer Rohextrakt	45	100	0
Filtration an Sephadex G-25	9.4	94	4.8
Isolierung über Trypsinharz	3.5	81	12.8
Ionenaustausch- chromatographie an SP-Sephadex C-25	0.27	38	166.6
Rechromatographie Fraktion III	0.26	62 ⁺	173.0

⁺) Bezogen auf die bei der Ionenaustauscher-
chromatographie gewonnene Fraktion III

Tab. 5: Übersicht der spezifischen Aktivitäten und der Ausbeuten nach den einzelnen Reinigungsschritten.

Die spezifische Aktivität des Gemisches aller 6 Fraktionen beträgt $0.27 \mu\text{g Protein/mIU}$ oder $3.700 \text{ mIU/mg Protein}$. Der Inhibitor konnte, ausgehend vom wässrigen Extrakt, etwa 170fach angereichert werden.

II. Charakterisierung

1. Hemmverhalten

a) Hemmspektrum

Das Inhibitorgemisch und jede der 6 Fraktionen hemmen Trypsin, Plasmin, Subtilisin, ferner in geringerem Ausmaß Schweinepankreas kallikrein und Acrosin aus Schweinespermien. Die Prüfung der Hemmfähigkeit gegenüber Proteasen wurde mit den im Abschnitt "Methoden" beschriebenen Verfahren durchgeführt.

b) Hemmkurven

Nach Vorlage einer bestimmten Menge Trypsin und nach Zugabe variierender Inhibitormengen wird die verbleibende tryptische Aktivität gemessen. Die Inkubationszeit für die Bildung des Protease-Inhibitor-Komplexes wird mit 5 Minuten angesetzt. Als Substrat dient N- α -Benzoyl-DL-arginin-p-nitroanilid. Aus der Abb. 2 ist Linearität zwischen dem Ausmaß der Trypsinhemmung und der Inhibitorkonzentration bis zu einer Hemmung von etwa 80 % ersichtlich.

Die Bestimmung der Hemmkurven erfolgte mit der rechromatographierten Fraktion III und mit dem Gemisch aller Fraktionen, wobei sich praktisch identische Kurven ergaben.

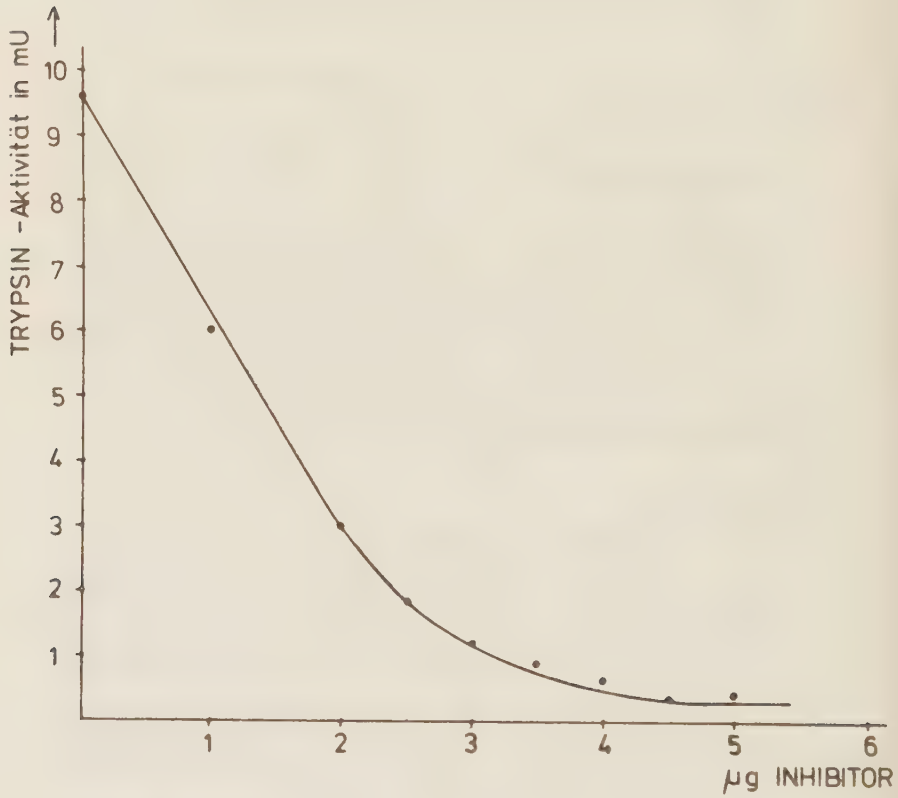


Abb. 2 Trypsin - Hemmkurve mit RWI III.
Abszisse: Inhibitormenge
Ordinate: Tryptische Restaktivität

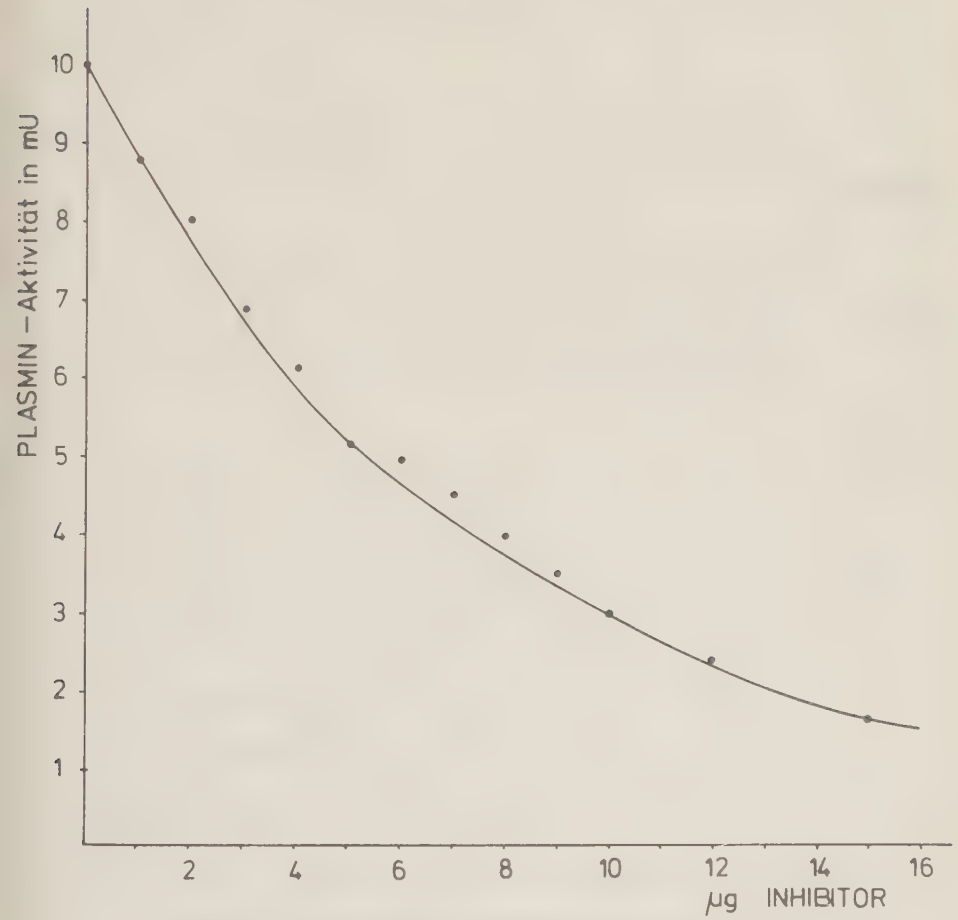


Abb. 3 Plasmin - Hemmkurve mit RWI III

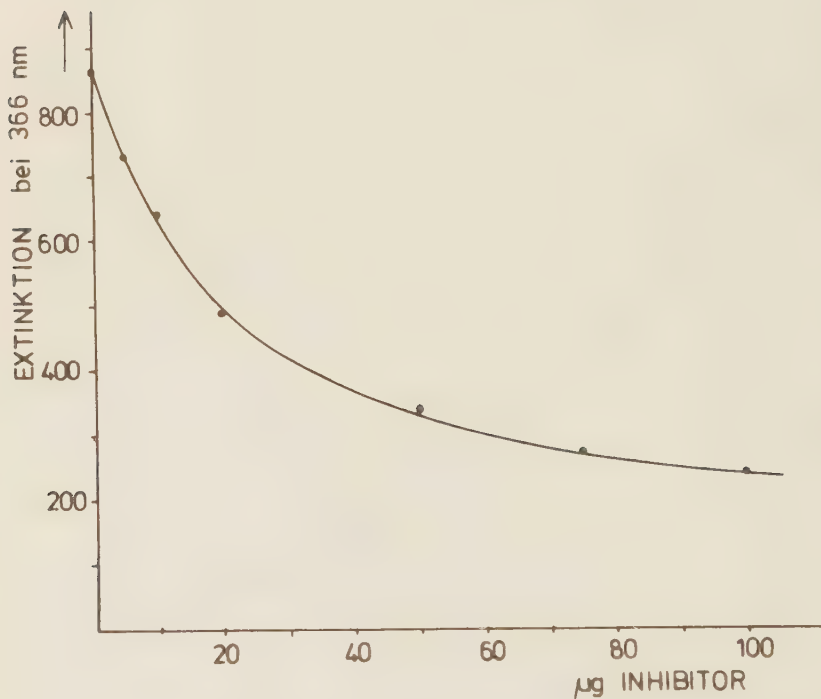


Abb. 4 Subtilisin - Hemmkurve mit RWI III

c) Temporäre Hemmung

Der Inhibitor aus Regenwürmern zeigt das Phänomen der temporären Hemmung (56). Bereits nach 25 Minuten ist der Inhibitor zu 50 % inaktiviert.

2. Bestimmung der Endgruppen

Die lyophilisierten Inhibitorfraktionen wurden nach der Methode von GRAY (32) mit Dansyl-Chlorid umgesetzt. Die

Identifizierung der markierten Aminosäuren erfolgte nach Hydrolyse durch zweidimensionale Chromatographie auf Polyamidplättchen (94).

Bei der Bestimmung der N-terminalen Gruppen konnte nur die rechromatographierte Fraktion III als einheitliches Protein mit den N-Termini Ala und Gly definiert werden.

Von den Fraktionen I und IV konnte infolge Materialmangels keine Endgruppenanalyse durchgeführt werden. Für die restlichen Fraktionen II, V und VI konnte infolge Materialmangels keine Rechromatographie durchgeführt werden, so ergab sich auch bei der Endgruppenanalyse kein einheitliches Bild.

3. Aminosäurezusammensetzung

Die Fraktionen wurden 24 Stunden lang in 6 N HCl bei 110 °C unter Zugabe eines Tropfens Thioäthylenglykol hydrolysiert und mit einem Aminosäureanalysator der Firma Beckman analysiert. Als Bezugsquelle wurde der Gehalt an Arginin oder Lysin verwendet.

Fraktion	I	II	III	V	VI
Molekulargewichte, berechnet aus der Anzahl AS	7350	6940	6950	6550	7890

Von Fraktion IV konnte mangels Substanz keine Aminosäureanalyse angefertigt werden.

III. Untersuchungen am reaktiven Zentrum

1. Definition des Hemmzentrums

Die Wirkung von als Trypsininhibitoren ausgewiesenen Proteinen beruht darauf, daß diese Eiweißkörper reaktive Peptidbindungen enthalten, die als Substrat für das aktive Zentrum des Trypsins dienen, während alle anderen, eben-

Amino- säuren	Inhibitorfraktionen				
	I	II	III	V	VI
	Aminosäuren pro Mol Protein				
Asp	7,81	6.32	6.80	5.82	6.46
Thr	5.22	1.67	1.35	2.58	2.63
Ser	7.31	6.25	6.15	6.35	6.73
Glu	4.80	5.15	5.75	5.92	6.33
Pro	6.03	5.00	5.94	4.84	5.99
Gly	4.31	6.25	9.20	6.25	7.16
Ala	4.42	3.30	4.00	3.20	3.66
Cys	3.95	7.67	5.30	3.72	7.86
Val	3.21	2.00	1.85	2.08	2.13
Meth	0.89	1.35	2.35	0.62	1.93
Ileu	0.92	2.30	1.56	2.71	1.91
Leu	2.40	1.68	0.66	0.85	0.78
Tyr	1.19	2.55	0.45	0.85	1.66
Phe	3.32	0.70	1.00	1.78	1.87
His	1.93	0.85	2.58	1.90	2.90
Lys	2.00	2.62	1.00	4.07	4.67
Arg	7.73	6.00	6.75	5.00	6.00
Summe der AS, Näherungswerte	66	63	65	60	72

Tab. 6 Aminosäureanalysen der Fraktionen I, II, III, V, VI

falls von Trypsin spaltbaren Peptidbindungen im Inhibitor-molekül sterisch geschützt sind. Die Hemmwirkung kann als Proteolyse erklärt werden, die auf verschiedenen Stufen des Proteolysevorganges unterbrochen sein kann.

Die Arbeitskreise um ACHER (1,17) und LASKOWSKI sen. (51, 52) konnten zum ersten Mal am Beispiel des polyvalenten Proteasen-Inhibitors aus Rinderlunge nachweisen, daß dessen Hemmwirkung durch eine bestimmte Aminosäure an definierter Stelle der Polypeptidkette, in diesem Fall Lysin, gewährleistet wird.

LASKOWSKI jun. konnte zeigen, daß Trypsin bei niederen H-Ionenkonzentrationen mit den reaktiven Peptidbindungen der Trypsin-Inhibitoren aus Sojabohnen und Ovomucoid unter Spaltung einer Arg-Ileu-bzw. Arg-Ala-Bindung reagiert (23, 24). Die aus der Reaktion hervorgehenden Inhibitoren werden als modifizierte Hemmstoffe bezeichnet. Sie sind wieder voll aktiv, verlieren aber ihre Hemmwirkung, wenn durch Carboxypeptidase B der an der Peptidbindung beteiligte Argininrest abgespalten wird. In diesem Fall werden die durch Trypsin freilegbaren Argininreste als aktive Zentren dieser Inhibitoren angesehen.

Daneben ist nach Untersuchungen von HOCHSTRASSER (44) die Funktionsfähigkeit der reaktiven Peptidbindungen vor allem auch in der besonderen Raumstruktur der Hemmstoffe zu sehen. Schon bei geringsten Störungen der Raumstruktur, die durch S-S-Brücken bedingt ist, geht die permanente Hemmwirkung verloren.

2. Modifizierung von Inhibitoren

Durch Modifizierung des Inhibitors aus Regenwürmern wurden Untersuchungen über dessen reaktives Zentrum angestellt.

a) Allgemeines

ϵ -Aminogruppen des Lysins werden durch Umsetzung mit Maleinsäureanhydrid reversibel acyliert. Mittels saurer Hydrolyse lassen sich die Maleoylreste wieder abspalten (15). Mit Hilfe eines Butandion-(2.3)-Reagens sind die Guanidionogruppen der Arginylreste modifizierbar (34).

Lysinhibitoren verlieren nach Axylierung der ϵ -Aminogruppen ihre Hemmwirkung gegenüber Trypsin vollständig. Arginin-Inhibitoren behalten ihre Hemmaktivität gegenüber Trypsin nach Umsetzung mit Maleinsäureanhydrid, verlieren diese jedoch bis auf eine geringe Restaktivität nach Reaktion mit dem Butandion-(2.3)-Reagens.

b) Modifizierung des RWI

Der mit Trypsinharz isolierte Trypsin-Inhibitor aus Regenwürmern behielt nach Umsetzung mit Maleinsäureanhydrid seine Hemmaktivität. Diese verschwand rasch nach Zugabe von Butandion-(2.3)-Reagens.

Auf diese Ergebnisse hin ist anzunehmen, daß bei dem Inhibitor ein Argininrest im reaktiven Zentrum enthalten ist. Durch Carboxypeptidase B wurde der mit Trypsinharz isolierte Inhibitor fast vollständig inaktiviert (96 % Verlust der Hemmaktivität), was auf die Spaltung der im reaktiven Zentrum enthaltenen Arg-X-Bindung zurückzuführen ist.

D. MATERIAL UND METHODEN

I. M a t e r i a l

1. Enzyme

Trypsin (EC 3.4.4.4), Novo Industri, Kopenhagen
23.5 AE/g, 4365 NF/mg, krist., lyophil.

Chymotrypsin (EC 3.4.4.5), Novo Industri, Kopenhagen,
1100 NF/mg, krist., lyophil.

Plasmin (EC 3.4.4.14), Novo Industri, Kopenhagen, 2.77
Novo-Einheiten/mg, lyophil.

Carboxypeptidase B (EC 3.4.2.2)

Subtilisin, Novo Industri, Kopenhagen

2. Substrate

N- α -Benzoyl-DL-arginin-4-nitroanilid-hydrochlorid (BAPA),
Merck AG, Darmstadt

N-Succinyl-L-phenylalanin-4-nitroanilid (SUPHEPA), Mann
Res. Lab., New York

3. Weitere Reagentien

Triäthanolamin-hydrochlorid (TRA), EGA-Chemie

Maleinsäureanhydrid, Schuchardt

Butandion-(2.3), EGA-Chemie

II. Methoden

1. Aktivitätsbestimmung der Proteasen

a) Trypsin (28, 66): Unter Verwendung von BAPA als
Substrat wird die Geschwindigkeit der Freisetzung von
p-Nitroanilin am Eppendorf-Photometer gemessen. Meßstrahl
405 mm, Schichtdicke 10 mm, Küvettenvolumen 3.0 ml, Meß-
temperatur 25 °C, Meßdauer 5 Min.

Ansatz: 0.2 ml einer Trypsinlösung (5 mg in 100 ml 0.0025 N
HCl), 1.8 ml TRA-Puffer (0.2 M, pH 7.8), 1.0 ml BAPA
(1.0 g BAPA in 1000 ml Wasser).

Variieren der Trypsinmenge zeigt, daß die Extinktions-
änderung streng linear dazu verläuft (66).

b) Chymotrypsin (28, 66): Als Substrat dient SUPHEPA.

Die Geschwindigkeit der Freisetzung von p-Nitroanilin wird wie bei dem Trypsin-Hemmtest gemessen. Meßstrahl 405 nm, Schichtdicke 10 mm, Küvettenvolumen 3.0 ml, Temperatur 25 °C, Meßzeit 10 - 30 Min.

Ansatz: 0.2 ml Chymotrypsinlösung, 1.8 ml TRA-Puffer (0.2 M mit 0.05 M CaCl_2 , pH 7.8), 1.0 ml Substratlösung.

c) Plasmin (28): Die Messung der Plasminaktivität erfolgt analog zur Trypsinbestimmung mit BAPA als Substrat.

d) Kallikrein (28): Das Prinzip beruht auf der Bestimmung des aus dem Substrat BAEE freigesetzten Äthanol mit Alkoholdehydrogenase. Meßstrahl 366 nm, Schichtdicke 10 mm, Küvettenvolumen 3.0 ml, Temperatur 25 °C, Meßzeit 10 Min.

Vergleichsküvette: 0.1 ml Nikotinamid-adenindinukleotid, 2.38 ml Puffer (15.2 g Natriumpyrophosphat, 4.1 g Semicarbazidhydrochlorid, 0.9 g Glycin in 400 ml deionisiertem Wasser lösen, auf pH 8.7 einstellen und auf 500 ml auffüllen), 0.02 ml ADH.

Meßküvette: 0.1 ml NAD, 2.28 ml Puffer, 0.02 ml ADH, 0.1 ml Probelösung. Die Ansätze werden 10 Min. lang inkubiert und anschließend durch Zugabe von je 0.5 ml BAEE-Lösung die Reaktion ausgelöst.

e) Leukozytenproteasen (45): Da für Leukozytenproteasen keine spezifischen Substrate existieren, bedient man sich des von allen Proteasen hydrolysierbaren Azocaseins. Seine Spaltprodukte sind in Trichloressigsäure löslich und ermöglichen somit die photometrische Verfolgung des Azocaseinabbaues anhand der Extinktionszunahme bei 366 nm.

Ansatz: 1.0 ml Phosphatpuffer (0.1 M., pH 8.0; 7.84 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ und 0.784 g KH_2PO_4 mit Wasser ad 500 ml lösen) mit 2.0 ml Azacasein-Lösung (2proz., 200 mg Azacasein unter

vorsichtigem Erwärmen im Wasserbad bis 80 °C in 10 ml Phosphatpuffer lösen) und enzymhaltiger Lösung im Reagensglas 1 - 3 Stunden lang im Wasserbad bei 37 °C inkubieren. Nach Zugabe von 3.0 ml Trichloressigsäure (5proz., 5.0 g in 100 ml Wasser lösen) und 5 Min. Stehen bei Zimmertemperatur wird zentrifugiert, der Überstand filtriert und dieser bei 366 nm in einer Küvette gemessen. Daneben bestimmt man auch einen Leerwert ohne Leukozytenproteasen.

Die Angabe definierter Enzymeinheiten ist hier wegen der Unspezifität des Substrates nicht möglich. Man vergleicht deshalb die proteolytische Aktivität der Leukozytenproteasen mit der Einwirkung definierter Trypsinmengen auf Azacasein und stellt dazu eine Eichkurve auf.

Eine Probe Leukozytenproteasen wurde dankenswerterweise von der Arbeitsgruppe HOCHSTRASSER an der HNO-Klinik der Universität München zur Verfügung gestellt.

2. Bestimmung der Inhibitoraktivität

Diese erfolgt durch Modifizierung der vorangehend beschriebenen Enzymteste, indem ein Teil des Puffers durch Inhibitorlösung ersetzt wird. Die Restaktivität des Enzyms wird gemessen und daraus die Inhibitoraktivität errechnet. Die Hemmaktivität wird bei etwa 50 % Hemmung des Enzyms ermittelt, da bei höheren Inhibitorkonzentrationen die Linearität zwischen Hemmwirkung und Konzentration aufgehoben ist.

Eine Inhibitoreinheit (IU) wird in Anlehnung an die internationale Enzymeinheit (U) als Inhibitormenge definiert, die unter Standardbedingungen die Aktivität einer Enzymeinheit vollständig hemmt, also den Substratumsatz um 1 $\mu\text{Mol/Min.}$ reduziert (28). 1 mIU eines Inhibitors verringert bei Verwendung von BAPA als Substrat die Extinktionsänderung ΔE um 0.00332/Min. in einem Ansatz von 3.0 ml.

3. Gewinnung der Extrakte

a) Herstellung des Homogenates

Regenwürmer wurden möglichst bald nach ihrer Gefangennahme zerschnitten und in Portionen von 400 - 600 g mit der dreifachen Menge entsalzten Wassers versetzt und mit einem Homogenisator etwa 10 Min. lang homogenisiert, bis eine Aufschwemmung feinsten Gewebspartikel und der in den Regenwürmern enthaltenen Erde entstand. Anschließend wurde mit einer Zentrifuge bei 8000 UpM 30 Min. lang zentrifugiert und das Zentrifugat je zwei Mal in den Bechern mit Wasser aufgerührt und erneut zentrifugiert.

b) Enteiweißung mit Perchlorsäure

Die zentrifugierten Rohextrakte wurden vereinigt und mit dem gleichen Volumen 6proz. Perchlorsäure verrührt. Nach etwa einstündigem Absetzenlassen der ausgefällten Proteine im Kühlschrank und Abfiltrieren des Überstandes durch Faltenfilter wurde mit einer berechneten Menge KOH neutralisiert und über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt, um einen möglichst vollständigen Ausfall des Kaliumperchlorates zu erzielen. Aussagen über das Ausmaß der Verluste an Inhibitoren bei diesen Reinigungsschritten können nicht gemacht werden, da der Inhibitor im Rohextrakt an im Überschuß vorhandene proteolytische Enzyme gebunden und dieser Komplex weder in 6 M Ammoniumsulfatlösung noch in 6 M Harnstofflösung und anschließender Gelfiltration über Sephadex G-75 zu trennen ist.

c) Einengung

Diese erfolgte im Büchi-Potationsverdampfer im Wasserstrahlvakuum bei einer Wasserbadtemperatur von 40 - 50 °C. An den ausgefallenen Salzen absorbiert Inhibitor wurde mit kleinen Mengen entsalzten Wassers ausgewaschen.

d) Gelfiltration

Zur weiteren Anreicherung des Inhibitors unterzog man die eingeeengten Extrakte der Gelfiltration über Sephadex G-25

fine. Elutionsmittel: 0.15 M KCl, 0.05 M TRA-Puffer, pH 7.8. Säule 2.8 x 120 cm. Der Verlust der eingesetzten Inhibitormenge lag bei 5 %.

4. Isolierung der Inhibitoren mittels Affinitätschromatographie

Die inhibitorhaltige Lösung wurde in einem Eisbad auf 0 - 3 °C gekühlt und käufliches Trypsin-Celluloseharz (Merck AG, Darmstadt) mittels Magnetrührung eingerührt, der pH-Wert überprüft und gegebenenfalls auf 7.8 nachgestellt. Nach 30 - 45 Min. Rühren waren über 90 % des Inhibitors an das Harz gebunden. Der Überstand wurde nach Zentrifugieren der Harzsuspension in einer Kühlzentrifuge verworfen und das Harz zur Entfernung noch vorhandenen Fremdproteins 5 mal mit Puffer (0.05 M TRA, 0.15 M KCl, 0.01 M CaCl_2 , pH 7.8) eluiert.

Um den Inhibitor wieder abzulösen, wurde das Trypsinharz mit KCl-HCl-Puffer (0.2 M KCl, pH 1.8) versetzt und etwa 5 Min. lang bei 0 - 3 °C gerührt, danach abzentrifugiert und dieser Vorgang etwa 4 - 5 Mal wiederholt, bis im Überstand keine Hemmaktivität mehr nachweisbar war.

5. Ionenaustauschchromatographie an SP-Sephadex C-25

Nach mehreren Vorversuchen mit verschiedenen Ionenaustauscherharzen wurden folgende Bedingungen gewählt: Sulfopropyl-Sephadex C-25 wurde in die saure Form übergeführt und mit 0.05 M Ammoniumformiat, pH 4.1 äquilibriert. Eluiert wurde mit einem linearen Kochsalzgradienten von 0 - 0.4 M NaCl, die von einer Peristaltikpumpe gesteuerte Elutionsgeschwindigkeit betrug konstant 4 ml/h.

Zur Auftrennung wurde eine Säule von 1.5 x 100 cm verwendet, an Puffer je 750 ml 0.05 M Ammoniumformiat, pH 4.1 sowie 0.05 M Ammoniumformiat mit 0.4 M NaCl,

pH 4.1. Nach der Auftrennung erfolgten Einengung und Entsalzung der Aktivitätsgipfel, anschließend Lyophilisation und Rechromatographie der Komponente III, die in relativ größter Ausbeute ausfiel.

6. Bestimmung der spezifischen Aktivität

Nach Einwiegen einer bestimmten Menge Inhibitor und Auflösen in deionisiertem Wasser erfolgte die Ermittlung der Aktivität mittels des Trypsinhemmtests. Aus den Werten ließ sich die spezifische Aktivität in mIU/mg bzw. μg Protein/mIU errechnen.

7. Charakterisierung der Inhibitoren

a) Aminosäurezusammensetzung

Die Tryptophanbestimmung erfolgte aus den UV-Spektren nach GOODWIN (31) an einem UV-Spektralphotometer. Der Inhibitor wurde in 0.1 M NaOH (1 mg/ml) gelöst und nach 70-stündiger Inkubation in Quarzküvetten der Schichtdicke 10 mm gemessen. Zur Aminosäureanalyse wurde 0.2 mg Protein in 4 ml 6 N HCl unter Zugabe eines Tropfens Thioäthylenglykol in Hydrolyseröhrchen von 0.5 cm Durchmesser eingeschmolzen und 24 Stunden bei 110 °C im Trockenschrank hydrolysiert. Danach erfolgte Einengung am Rotationsverdampfer bis zur Trockne und Analyse nach der Methode von SPACKMAN, STEIN und MOORE (77) an einem Beckman-Multichrom-Aminosäureanalysator.

b) Molekulargewichtsbestimmung

Diese wurde mittels Gelfiltration über Sephadex G-75 durchgeführt (27). Als Puffer diente 0.05 M Natriumcitrat, pH 2.5, als Eichsubstanzen Trypsin-Kallikrein-Inhibitor aus Rinderlunge, Ribonuklease, Chymotrypsinogen und Dextranblau. Die Säule hatte die Maße 1.5 x 120 cm, die Elutionsgeschwindigkeit 6 ml/h.

c) Bestimmung der N-terminalen Gruppen

Sie erfolgte nach der Methode von GRAY (32) mit 1-Dimethylaminonaphthalin-5-sulfonylchlorid (kurz Dansylchlorid) und anschließender zweidimensionaler Chromatographie der markierten Aminosäuren auf Polyamidschichten (94).

1 - 10 nM Inhibitor wurden in 10 μ l 0.2 M Natriumhydrogencarbonat gelöst, kurz geschüttelt und über Phosphor-
pentoxid im Exsiccator getrocknet. Danach erfolgte Zugabe von 10 μ l deionisiertem Wasser und 10 μ l Dansylchlorid (aus einer Lösung von 2 mg 1-Dimethylaminonaphthalin-5-sulfonylchlorid pro ml Aceton) und einstündiger Inkubation bei 37 °C. Nach abermaliger Trocknung wurden 50 μ l 6 N HCl zugegeben und 15 h bei 110 °C in einem zugeschmolzenen Reagensgläschen hydrolysiert. Nach der Hydrolyse wurde die Lösung geschüttelt, über NaOH getrocknet und in 10 μ l 50proz. Pyridin gelöst.

Zur zweidimensionalen Chromatographie auf Polyamidplättchen des Formats 3 x 3 cm kamen folgende Laufmittel zur Anwendung:

1.5proz. Ameisensäure

Benzol/Eisessig 9:1 (v/v)

Essigsäureäthylester/Methanol/Eisessig 20:1:1

Die Identifizierung der dansylierten Aminosäuren erfolgte im UV-Licht anhand von Vergleichssubstanzen.

8. Untersuchungen am reaktiven Zentrum

a) Modifizierung von Lysylresten

Diese erfolgte durch Umsetzung mit Maleinsäureanhydrid (15). 1 mg Inhibitorprotein, 15 mg Natriumhydrogencarbonat und 10 mg gepulvertes Maleinsäureanhydrid wurden in einem Zentrifugenglas fein zerrieben und unter Zufügen einer 0.1 M Natriumhydrogencarbonatlösung bei 0 - 4 °C 10 - 15 Min. lang geschüttelt, bis eine klare Lösung entstand.

Mit 0.25 ml Wasser wurden durch das Schütteln am Glas haftende und noch ungelöste Teilchen in die Lösung gespült und nach 30 Min. Stehen bei Zimmertemperatur die Inhibitoraktivität gegen Trypsin bestimmt.

b) Modifizierung von Arginylresten (34)

Durch Reaktion mit Butandion-(2.3)-Reagens wurden spezifisch Arginylreste modifiziert.

0.2 ml Inhibitorlösung, die etwa 3000 mIU antitryptischer Aktivität enthielten, wurden mit 0.2 ml 1 M Natriumhydrogencarbonat/Natriumcarbonat-Puffer (pH 8.6) und 0.2 ml des nach den Angaben von GROSSBERG und PRUSSMAN (34) bereiteten Butandion-(2.3)-Reagens versetzt und bei 25 °C inkubiert. Nach bestimmten Zeiten erfolgte die Entnahme von Proben zur Bestimmung der Hemmaktivität.

c) Umsetzung mit Carboxypeptidase B

Die Enzymsuspension wurde mit 0.2 M Tris-HCl-Puffer, pH 8.0 auf das Zehnfache verdünnt, die Inkubation in 0.4 ml desselben Puffers mit 1 bis 2 Gewichtsprozent des Enzyms bei 25 °C durchgeführt.

F.

ZUSAMMENFASSUNG

Aus entweißten Extrakten von Regenwürmern konnten Inhibitoren für Trypsin und Plasmin gewonnen werden. Die Isolierung erfolgte mit Hilfe eines spezifischen Verfahrens durch selektive Bindung an wasserunlösliches Trypsinharz. Nach der Bindung des Inhibitors an das Trypsinharz, Auswaschen der Begleitsubstanzen mit Salzpuffer-Lösungen, Dissoziation des unlöslichen Komplexes in sauren Salzlösungen wurde ein uneinheitliches Inhi-

bitorpräparat mit relativ hoher spezifischer Aktivität erhalten. Durch Chromatographie an Sulfopropyl-Sephadex konnte das Inhibitorgemisch in 6 Fraktionen aufgetrennt werden, die im wesentlichen gleiche Eigenschaften aufweisen.

Die Molekulargewichte dieser Fraktionen, bestimmt durch Gelfiltration und Berechnung aus der Aminosäurezusammensetzung liegen zwischen 6500 und 7300, Fraktion VI zeigt ein etwas höheres bei 7900.

Vermutlich handelt es sich bei den 6 Fraktionen um Isoinhibitoren, die durch Modifizierung während der Komplexbildung am Trypsinharz entstanden.

Alle Inhibitorfraktionen hemmen Trypsin und Plasmin, schwächer Schweineakrosin und Schweinepankreas kallikrein; nicht gehemmt wird Chymotrypsin, wie auch BEWLEY und DEVILLEZ (9) das Auftreten von Chymotrypsin oder einer chymotrypsinähnlichen Protease in Regenwürmern nicht beobachten konnten. Ebenso kommt ein Chymotrypsin-Inhibitor in Blutegeln, einem nahen Verwandten der Lumbriciden, nach Untersuchungen von FRITZ und FINK (42) nicht vor, wohl aber in *Ascaris lumbricoides* (70) als Schutz gegen die chymotrypsinhaltigen Pankreassekrete des Menschen und der Säugetiere, die er als Parasit befällt. Die Hemmwirkung ist temporär, d.h. die Inhibitoren werden durch die von ihnen hemmbaren Proteasen abgebaut.

Bei der Umsetzung mit Butandion-(2.3)-Reagens verlor der Inhibitor seine Aktivität und ist somit der Gruppe der Inhibitoren mit Arginin im aktiven Zentrum zuzuordnen.

Weitergehende Untersuchungen waren noch nicht möglich, da die Gewinnung größerer Mengen Ausgangsmaterial sehr schwierig ist.

F. LITERATUR

1. Acher, R., J. Chauvet, R. Arnon, M. Sela, Europ. J. Biochem. 3, 476 (1968)
2. Ascoli, M., C. Bezzola, Berl. Klin. Wschr. 40, 391 (1903)
3. Astrup, T., J. Sterndorf, Scand. J. clin. Invest. 7, 239 (1955)
4. Astrup, T., O. K. Albrechtsen, Scand. J. clin. Invest. 9, 233 (1957)
5. Bauer, E., E. K. Frey, H. Kraut, F. Schultz, E. Werle, Naturwissenschaften 17, 672 (1929)
6. Bauer, J., Z. Immun. Forsch. Orig. 5, 186 (1910)
7. Behlohlawek, L., Ber. Getreidechemiker - Tagung Detmold 1964, S. 19
8. Bernard, Cl., Lecons de physiol. experim. II, p. 406, Paris 1856
9. Bewley, B. G. C., E. J. DeVillez, Comp. Biochem. Physiol. 25, 1001 (1968)
10. Bittorf, Deutsch. Arch. f. Klin. Med. 91 IX
11. Bodman, J., Clin. Chim. Acta 3, 108 (1958)
12. Bowman, D. E., Proc. Soc. exp. Biol. Med. 57, 139 (1944)
13. Brieger, L., J. Trebing, Berl. Klin. Wschr. 45, 1041 (1908)
14. Brush, J. S., Biochem. Biophys. Res. Commun. 53, 894 (1973)
15. Butler, P. J. C., J. I. Harris, B. S. Hartley, R. Leberman, Biochem. J. 103, 78 P (1967), Biochem. J. 112, 679 (1969)
16. Camus, L., E. Gley, C. R. Soc. Biol. 49, 8 (1897)
17. Chauvet, J., R. Acher, J. Biol. Chem. 242, 4274 (1967)
18. Collier, H. B., Canad. J. Res. 19 B, 90 (1941)
19. Creutzfeldt, W., H. Schmitt, Scand. J. Gastroenter. 4, 47 (1970)
20. Eisner, G., Zschr. f. Immunitätsforschung Orig. I, 650 (1908/09)

21. Feeny, R.E in (30)
22. Fermi, C., L. Pernossi, Zschr. Hyg. 18, 83 (1894)
23. Finkenstadt, W.R., M. Laskowski, jr., J. Biol. Chem. 240, PC962 (1965)
24. Finkenstadt, W.R., M. Laskowski, jr., J. Biol. Chem. 242, 771 (1967)
25. Fraenkel, A., Conrat, R.C. Bean, E.D. Ducey, H.S. Olcott, Arch. Biochem. 37, 393 (1952)
26. Frenzel, J.,: "Die Verdauung lebenden Gewebes und die Darmparasiten", du Bois Archiv 1891, S. 293
27. Fritz, H., I. Trautschold, E. Werle, Z. physiol. Chem. 342, 253 (1965)
28. Fritz, H., I. Trautschold, E. Werle, in: H.U. Bergmeyer "Methoden der enzymat. Analyse", Verl. Chemie, Weinheim 1974
29. Fritz, H., J. Huller, M. Wiedemann, E. Werle, Z. physiol. Chem. 348, 405 (1967)
30. Fritz, H., H. Tschesche, L.J. Greene, E. Truscheit: Proceedings of the Second Internat. Res. Conf. - Bayer Symposium V, Springer, Berlin 1974
31. Goodwin, T.W., R.A. Mortau, Biochem. J. 40, 628 (1946)
32. Gray, W.R., in "Methods in Enzymology, Vol. XI, New York 1967, S. 139
33. Green, T.R., C.A. Ryan, Science 175, 776 (1972)
34. Grossberg, A.L., D. Pressman, Biochemistry (Washington 7, 272 (1968)
35. Haendle, H., H. Fritz, I. Trautschold, E. Werle, Z. Physiol. Chem. 343, 185 (1965)
36. Haendle, H., H. Ingrisich, E. Werle, Z. physiol. Chem. 351, 545 (1970)
37. Haendle, H., I. Trautschold, R. Vogel, E. Werle, Z. physiol. Chem.
38. Haendle, H., Dissertation Med. Fakultät Univ. München (1966)
39. Hahn, M., Berl. klin. Wschr. 34, 499 (1897)
40. Ham, W.E., R.M. Sandstedt, J. Biol. Chem. 154, 505 (1944)

41. Hedin, S.G., J. Physiol. 30, 195 (1903/04)
42. Heimbürger, N., H. Haupt, H.G. Schwick in Proc. of the
Internat. Res. Conf. on Proteinase
Inhibitors, Munich 1970, Walter de
Gruyter, Berlin - New York 1971
43. Heran, H., Z. vergl. Physiol. 39, 44 (1956)
44. Hochstrasser, K., S. Schwarz, K. Illchmann, E. Werle,
Z. physiol. Chem. 349, 1449 (1968)
45. Hochstrasser, K., Persönl. Mitteilung
46. Jobling, J.W., W. Petersen, J. Exp. Med. 19, 459 (1914)
47. Kazal, L.A., D.S. Spicer, R.A. Brahinsky, J. Amer. Chem.
Soc. 70, 3034 (1948)
48. Kolaczek, Müller, Deutsche Med. Wschr. 7 (1907)
49. Kraut, H., E.K. Frey, E. Werle, Z. physiol. Chem. 192, 1 (1930)
50. Kraut, H., E.K. Frey, E. Werle, F. Schultz, Z. physiol. Chem.
230, 259 (1934)
51. Kress, L.F., Laskowski, M. sen., J. Biol. Chem. 242, 4925 (1967)
52. Kress, L.F., K.A. Wilson, M. Laskowski sen., J. Biol. Chem.
243, 1758 (1968)
53. Kunitz, M., J.H. Northrop, J. gen. Physiol. 19, 991 (1936)
54. Kunitz, M., Science 101, 668 (1945)
J. gen. Physiol. 29, 149 (1946)
55. Landsteiner, K., Zbl. Bakt. 27, 357 (1900)
56. Laskowski, M. jr., F.C. Wu, J. Biol. Chem. 204, 797 (1953)
57. Laskowski, M. jr., in D. Desnuelle, H. Neurath, M. Ottesen,
Structure - Function Relationships
of Proteolytic Enzymes, Munksgaard,
Copenhagen 1970, S. 89
58. Laurell, C.B., S. Eriksson, Clin. Chim. Acta 11, 395 (1965)
59. Learmonth, E.M., J.C. Wood, Chem. Ind. (London) 51, 1569
" (1960)
60. Leon, F., Bull. de l'Acad. Royale des Sciences des Lettres
et des Beaux - Arts, 47^{me} année,
2. Série, 1878, T. 46, p. 221
61. Mansfeld, V., M. Pybak, Z. Horakova, J. Hladovec, Z. physiol.
Chem. 318, 6 (1960)

62. Martin, C.J., A.E. Axelrod, J. Biol. Chem. 224, 309 (1957);
Biochim. biophys. Acta 26, 490 (1957);
Biochim. biophys. Acta 27, 52 (1958)
63. Marx, R., P. Clemente, E. Werle, W. Appel, Blut 5, 367 (1959)
64. Marx, R., 4. Hamburger Symp. über Blutgerinnung 1961
65. Meyer, K., Folia serolog. VII, 472 (1911)
66. Nagel, W., F. Willig, W. Peschke, F. H. Schmidt, Z. physiol.
Chem. 340, 1 (1965)
67. Ozawa, K., M. Laskowski jr., J. Biol. Chem. 241, 3955 (1966)
68. Pavy, Philosoph. Transactions, 1863, vol. 153, part II,
p. 161
69. Peanasky, R.J., Fed. Proc. 22, 246 (1963)
70. Peanasky, R.J., G.M. Abu-Erreish, in Proc. of the
Internat. Res. Conf. on Proteinase
Inhibitors, Munich, Nov. 1970, Walter
de Gruyter, Berlin - New York, 1971
71. Pugliese, Coggi, Bulletino Scienze med. (1897)
72. Ryan, C.A., A.K. Balls, Proc. nat. Acad. Sci. 48, 1839 (1962)
73. Schnebli, H.P., in (30)
74. Schwartz, O., Wien. Klin. Wschr. 22, 1151 (1909)
75. Shain, Y., A.M. Mayer, Physiol. Plant 18, 853 (1965)
76. Sohonie, K., K.S. Ambe, Experientia 12, 302 (1956)
77. Spackman, D.H., W.H. Stein, S. Moore, Anal. Chem. 30,
1190 (1958)
78. Stambaugh, R.L., in K.S. Moghissi, E.S.E. Hafez: Biology
of Mammalian Fertilization and Implan-
tation, Charles C. Thomas, Springfield, Ill.
1972
79. Tauber, E., B.P. Kershaw, R.D. Wright, J. Biol. Chem. 179,
1155 (1949)
80. Trautschold, I., E. Werle, H. Haendle, H. Sebening,
Z. physiol. Chem. 332, 328 (1963)
81. Trautschold, I., G. Rüdell, Klin. Wschr. 41, 297 (1963)
82. Trautschold, I., Habilitationsschrift, Medizin. Fakultät
d. Univ. München (1965)

83. Trautschold, E., E. Werle, G. Zickgraf - Rüdell, *Biochem. Pharmacol.* 16, 59 (1967)
84. Viola, Gaspardi, *Arch. de Biol. Ital.*, 1889, XII, p. VII
85. Vogel, R., I. Trautschold, E. Werle, *Natürliche Proteasen-Inhibitoren*, G. Thieme Verlag, Stuttgart, 1966
86. Vogel, R., G. Hartwig, *Persönl. Mitteilung*
87. Wanke, M., W. Nagel, M. M. Lindner, H. Sebening, *Z. Gastroenterol.* 6, 434 (1968)
88. Weinland, E., *Z. Biol.* 44, 1 (1903)
89. Werle, E., L. Maier, F. Löffler, *Biochem. Z.* 321, 372 (1951)
90. Werle, E., L. Maier, E. Ringelmann, *Naturwiss.* 39, 328 (1952)
91. Werle, E., K. Tauber, W. Hartenbach, M. M. Forell, *Münchn. med. Wschr.* 100, 1265 (1958)
92. Wiens, *Münchn. Med. Wschr.* 49, 2637 (1907)
93. Wiens, *Deutsch. Arch. f. Klin. Med.* 91, XX
94. Woods, K. R., K.-T. Wang, *Biochim. biophys. Acta* 133, 369 (1967)
95. Zaneveld, L. J. D., K. L. Polakoski, R. T. Robertson, W. L. Williams in *Proc. of the Internat. Res. Conf. on Proteinase Inhibitors*, Munich, Nov. 1970, Walter de Gruyter, Berlin - New York 1971

Lebenslauf

Geboren: 14.10.1939 in Troppau /Sudetenland
Vater: Dr. Walter Illichmann, Reg. Rat
Mutter: Anni, geb. Wallek
1945 - 1949 Volksschule in Teschen/O.S., Neuburg/Donau, Ingolstadt
1949 - 1958 Oberrealschule in Ingolstadt, Füssen/Allgäu, Passau und Regensburg
Reifeprüfung Juni 1958
seit Oktober 1958 Chemiestudium an der Universität Wien,
seit November 1959 ab November 1959 fortgesetzt an der Universität München
November 1962 Diplom-Vorprüfung
Mai 1966 Diplom-Hauptprüfung, anschließend Diplomarbeit am Institut für Organische Chemie der Universität München bis Juni 1967
Juli 1967 - wissenschaftl. Hilfskraft am Institut für
März 1969 Klinische Chemie an der Chirurg. Klinik der Universität München
April 1969 - Verwalter der Dienstgeschäfte eines wiss.
Dezember 1969 Assistenten am Institut für gerichtliche und Versicherungsmedizin der Univ. München
Mai 1969 Beginn des Zweitstudiums der Medizin an der Universität München
Januar 1970 - Verwalter der Dienstgeschäfte eines wiss.
September 1974 Assistenten am Institut für Klinische Chemie und Klinische Biochemie
September 1969 Vorphysikum
Oktober 1971 Physikum
April - August 1975 Staatsexamen

